

MARÍLIA OLIVEIRA BARBOSA

**Biocompatibilidade de sistemas adesivos autocondicionantes
experimentais livres de HEMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de concentração em Dentística.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana Fernandes da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho

Pelotas, 2011

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana Fernandes da Silva (Orientadora)

Prof. Dr. Fabio Garcia Lima

Prof^a. Dr^a. Andréa da Silva Ramos Rocha

Prof^a. Dr^a. Adriana Etges (suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A minha mãe, Rosa, pelo amor e paciência incondicionais. Obrigada por sempre estar presente na minha vida principalmente nas horas mais difíceis. Te amo muito mãe.

Ao meu pai, Delamar, principalmente pelo incentivo ao estudo. Te amo pai.

Aos meus irmãos, Vinícius e Marta, pelo companheirismo, paciência e apoio. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Adriana Fernandes da Silva, pelos ensinamentos, apoio, disposição e pela constante presença no laboratório me ajudando na realização desse projeto.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho, pela disponibilidade, ensinamentos e paciência. Aprendi muito contigo no laboratório.

Aos meus professores da pós-graduação, pelos ensinamentos transmitidos e pela ajuda no meu crescimento profissional e pessoal.

A Caroline Ely, que mais que uma colega é uma grande amiga que a pós-graduação me deu. Obrigada pela amizade, pelas conversas e pelas ajudas no laboratório.

À técnica do CDC-Bio Tatiana Ramos pela paciência, companheirismo e ensinamentos no laboratório.

Ao Prof. Dr. Cesar Henrique Zanchi, um dos colaboradores desse trabalho e que me ajudou muito não só neste momento, mas também quando eu entrei como professora substituta. Valeu Tino.

À secretária do Programa de Pós-Graduação, Josiane da Silva.

A todos meus amigos e colegas da Pós-Graduação, especialmente Sonia, Eliana, Fabiane, Aline, Grégori e Laura que entramos juntos e nossa convivência amenizou as muitas aulas e seminários que preparamos. Com vocês aprendi e cresci muito.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, representado pelo coordenador Professor Flávio Fernando Demarco.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) por conceder minha bolsa de estudos.

Resumo

BARBOSA, Marília Oliveira. **Biocompatibilidade de sistemas adesivos autocondicionantes experimentais livres de HEMA**. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

HEMA é o monômero mais utilizado nos sistemas adesivos, embora o desempenho biológico venha sendo negativo está se tentando resolver este problema testando novos monômeros com menor potencial citotóxico. Analizamos a biocompatibilidade de cinco monômeros dimetacrilatos: Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, PEG 400, PEG 400 UDMA, PEG 1000. Para analisá-los foi feito teste *in vitro* com cultura de células 3T3 de fibroblastos de ratos. Primeiramente, um teste citotóxico foi feito usando primers em concentrações de 2% e 20%. As diluições ficaram em contato com as células por um período de 24 horas, e a quantidade de células viáveis foi avaliada por meio de espectrofotômetro infravermelho, usando ensaio MTT. Um segundo teste foi realizado nos adesivos. Eles foram polimerizados e deixados em imersão em DMEM por 24 horas e depois o eludato obtido foi inserido nas células 3T3 por 24 horas. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal Wallis seguido pelo teste complementar de Dunn's ($p < 0,05$). O grau de conversão dos adesivos também foi analisado. Os resultados mostram que, em relação aos primers, na concentração de 2%, PEG 1000 não apresentou diferença estatística do controle. Na concentração de 20% não houve diferença com o Bis-EMA 10 e PEG 1000. Em relação ao eludato não houve diferença estatística com o Bis-EMA 10 e PEG 400 UDMA. Todos monômeros tiveram grau de conversão similar ao HEMA. Outros estudos são necessários usando diferentes concentrações e diferentes linhagens celulares porque esses monômeros são promissores no uso em sistemas adesivos.

Palavras-chave: Teste de citotoxicidade. Monômero. HEMA. Grau de conversão. Sistemas adesivos.

Abstract

BARBOSA, Marília Oliveira. **Biocompatibilidade de sistemas adesivos autocondicionantes experimentais livres de HEMA**. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

HEMA is a monomer widely used in the adhesive systems, although the biologic performance has been found as negative it has been tried to solve this problem by testing new monomers with lower citotoxic potential. We analyzed the biocompatibility of five experimental dimethacrylate monomers: Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, PEG 400, PEG 400 UDMA, PEG 1000. First, it was made an *in vitro* test using 3T3 mouse fibroblast cell culture. So, the cytotoxic test was made using primers at 20% and 2%. The dilutions were maintained in contact with the cells for a period of 24h and after the survival these cells was verified photometrically using MTT assay. After it was performed cytotoxic test with the resin bonds as follows: these monomers were polymerized and leaving in immersion in DMEM for 24h and later the eluate obtained was inserted on the 3T3 cell for 24h. The statistical analysis was performed by Kruskal wallis method, followed by a multiple-comparison Dunn's test ($p < 0.05$). Second, the degree of conversion of adhesive resin was also analyzed. The results showed that related to the primers in the concentration of 2% only PEG 1000 group had no statistical difference with the control group. In the concentration of 20% there was no difference among Bis-EMA 10, PEG 1000 and the control group. Concerning to eluates there were no difference among Bis-EMA 10, PEG 400 UDMA and the control group. All monomers showed a degree of conversion similar than HEMA. Other studies are necessary using different concentrations and different cell lines because these monomers are promising in the use of adhesive systems.

Keywords: Cytotoxicity test. Monomer. HEMA. Degree of conversion. Adhesive systems.

Lista de Figuras

Figura 1	Solução de estoque e diluições dos monômeros.....	22
Figura 2	Citotoxicidade em seis diferentes primers em concentração de 2%.....	53
Figura 3	Citotoxicidade em seis diferentes primers em concentração de 20%.....	54
Figura 4	Citotoxicidade em seis diferentes eludatos.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1	Peso, fórmula e estrutura molecular de diferentes dimetacrilatos surfactantes.....	19
Tabela 2	Composição dos <i>primers</i> autocondicionantes contendo diferentes monômeros surfactantes.....	20
Tabela 3	Composição das resinas de cobertura contendo diferentes monômeros surfactantes.....	20
Tabela 4	Grau de conversão em percentagem dos seis adesivos testados.....	57

Lista de Siglas e Abreviaturas

%	Percentual
®	Símbolo indicativo de marca registrada
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
<	Menor
>	Maior
Bis-EMA	Bisfenol A glicil dimetacrilato etoxilado
Bis-GMA	Bisfenol A glicil dimetacrilato
°C	Graus Celsius
cm ⁻¹	Centímetros reversos
CQ	Canforoquinona
DMEM	Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco's
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDAB	Etil 4-dimetilamino benzoato
et al.	E outros
FO/UFPel	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas
GDMA-P	Mistura equimolar de glicerol tetrametacrilato fosforado e glicerol dimetacrilato fosforado
H	Hora
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
Mg	Miligramas
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase
MN	Micronúcleos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

PBS	difeniltetrazólio
PEG	Tampão fosfato salino
PEGDMA 400 UDMA	Poli(etilenoglicol dimetacrilato
	Poli(etilenoglicol dimetacrilato 400
	uretano
RT-FTIR	Espectrofotômetro infravermelho com
	Transformada de Fourier – Tempo Real
S	Segundo
SFB	Soro fetal bovino
TEGDMA	Tri(etileno glicol dimetacrilato
UDMA	Uretano dimetacrilato
V	Volume

Sumário

Resumo.....	05
Abstract.....	06
Lista de Figuras.....	07
Lista de Tabelas.....	08
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	09
1 PROJETO DE QUALIFICAÇÃO.....	13
1.1 Introdução.....	14
1.2 Justificativa.....	17
1.3 Objetivos.....	18
1.4 Materiais e Métodos.....	19
1.4.1 Desenvolvimento dos sistemas adesivos autocondicionantes	19
1.4.2 Teste de Citototoxicidade.....	21
1.4.2.1 Análise de citotoxicidade: Ensaio MTT.....	21
1.4.3 Teste de genotoxicidade por micronúcleos.....	22
1.4.4 Análise da capacidade inibitória de MMPs dos monômeros surfactantes....	24
1.4.5 Análise da cinética de conversão dos adesivos experimentais.....	25
1.5 Referências.....	26
1.6 Aspectos Éticos.....	29
1.7 Cronograma.....	30
1.8 Orçamento.....	31
2 Relatório do trabalho de campo.....	33
3 ARTIGO.....	35
Title Page.....	36
Abstract.....	37
Introduction.....	38
Materials and Methods.....	40
Results.....	43
Discussion.....	44
Conclusion.....	47
Acknowledgments.....	48
References.....	49

Figures.....	53
Tables.....	56
4 Conclusão.....	58
5 Referências.....	59
Apêndices.....	63

1 PROJETO DE QUALIFICAÇÃO

1.1 Introdução

Um dos monômeros mais utilizados nos adesivos dentinários atuais é o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) devido à sua polaridade inerente que lhe permite infiltração na dentina parcialmente desmineralizada de forma eficiente (VAN LANDUYT *et al.*, 2008). Esses monômeros metacrilatos quando polimerizados são convertidos em material sólido. Entretanto se não forem totalmente convertidos, poderão ser liberados à cavidade bucal e alcançar, através dos túbulos dentinários, o tecido pulpar. Desta forma, eles podem causar danos celulares e também alcançar a corrente sanguínea fazendo com que fiquem disponíveis em todo o organismo por um longo período de tempo. Em virtude disso, seria oportuno analisar seus potenciais efeitos tóxicos (DURNER *et al.*, 2009; PAWLOWSKA *et al.*, 2010; POPLAWSKI *et al.*, 2009).

Ademais, é possível ainda que esses monômeros oriundos dos adesivos possam permanecer em contato direto com a rede de colágeno exposta pelo condicionamento ácido, mesmo após a polimerização do sistema adesivo (CARVALHO *et al.*, 2009). Além disso, existe a questão de que esses monômeros não reagidos podem ser liberados durante o processo de degradação do material (DURNER *et al.*, 2009; KOSTORYZ *et al.*, 2009).

Deste modo, apesar do HEMA ser bastante utilizado na odontologia, vários estudos demonstram que esse monômero apresenta efeito citotóxico (HUANG; CHOU; CHANG, 2003; LANZA *et al.*, 2009; PAWLOWSKA *et al.*, 2010; WALTHER *et al.*, 2002). As concentrações de HEMA disponíveis para difusão através da camada de dentina podem variar de 1,5 a 8mM e, desta forma podem chegar facilmente à polpa. Como consequência, essas concentrações podem ser altas o suficiente para causar efeitos adversos, como a modificação da resposta inflamatória normal (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006). O conceito comum de citotoxicidade é o de que a célula é morta pelo material tóxico, e os ensaios utilizados tendem a demonstrar isso (FRESHNEY, 2001). As citotoxinas podem ter efeito reversível ou irreversível e seus efeitos podem ser imediatos ou mediatos, podendo levar até algumas semanas (FRESHNEY, 2001). Em vista desses problemas, adesivos livres de HEMA têm sido desenvolvidos (FURUKAWA *et al.*, 2008; HIRAISHI *et al.*, 2007; IKEMURA; ICHIZAWA; ENDO, 2009; TORKABADI *et al.*, 2008). Dentre essas possibilidades uma alternativa são os monômeros surfactantes dimetacrilatos. Esses

monômeros dimetacrilatos apresentam diferentes comprimentos de cadeia, podendo ser alternativa viável no controle das propriedades de materiais odontológicos, ajustando-os para aplicações específicas (OGLIARI *et al.*, 2008). Entre esses monômeros tem-se utilizado o Bis-EMA que é análogo ao Bis-GMA, contudo é menos viscoso e tem se apresentado como um reagente em potencial para compor um grande número de produtos odontológicos, como os adesivos, sendo hoje em dia comercializados por fabricantes de produtos químicos (OGLIARI *et al.*, 2008). Outra alternativa, seria também o dimetacrilato surfactante polietilenoglicol di-metacrilato (PEG).

Os agentes surfactantes são compostos que apresentam moléculas com ambas características: hidrofílica e hidrofóbica. Portanto, promovem a mistura da água com componentes orgânicos, ajudando assim a diminuir a ocorrência de separação de fases, sendo abundantemente empregado na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (IRELAND *et al.*, 2004).

Na odontologia, recentemente, tem sido sugerida uma nova formulação de adesivos experimentais autocondicionantes de dois passos contendo alguns tipos desses monômeros surfactantes (ZANCHI *et al.*, 2010). Nesta pesquisa, onde se comparou os sistemas adesivos experimentais livres de HEMA com adesivos com HEMA obteve-se resultados do teste de microtração semelhante ao adesivo com HEMA. Entretanto, embora estes resultados preliminares *in vitro* demonstrem que estes novos sistemas apresentam resultados mecânicos satisfatórios, até o momento nenhum estudo foi encontrado demonstrando as propriedades de biológicas destes adesivos.

Assim, um importante requisito a ser considerado dos adesivos odontológicos existentes comercialmente ou em vias de despontar no mercado é a biocompatibilidade¹, uma vez que o material frequentemente permanece em íntimo contato com os tecidos dentários por um longo período de tempo, não devendo também induzir resposta inflamatória ou imune (HUANG; CHOU; CHANG, 2003). Ademais, existe pouca informação a respeito desses tipos de testes, principalmente os que avaliam a genotoxicidade dos adesivos odontológicos (HUANG; CHOU; CHANG, 2003). Logo, os possíveis efeitos danosos desses materiais têm bastante

¹ Biocompatibilidade: Entende-se como biocompatibilidade a habilidade de um material provocar o desfecho de uma resposta específica em um organismo ou tecido vivos (BROWNE, 1994).

importância, pois eles podem resultar em morte celular e mutações (POPLAWSKI *et al.*, 2009).

Além desses, outra relevante análise a ser feita seria do potencial inibidor dos componentes dos adesivos odontológicos em relação às metaloproteinases (MMPs), especialmente a MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B). Estas enzimas, além de estarem presentes nos processos fisiológicos, patológicos e de reparo, apresentam um importante papel quando da degradação da camada híbrida (CARVALHO *et al.*, 2009; RENO; TRAINA; CANNAS, 2008).

As MMPS presentes na matriz dentinária estão relacionadas com o processo adesivo e contribuem para a progressiva degradação da adesão na interface resina composta-dentina ao longo do tempo (CARRILHO *et al.*, 2007; CARRILHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009). Para a adesão à dentina é necessária formação da camada híbrida, porém sua durabilidade é limitada e o seu processo de degradação é consequência de diversos fatores como, por exemplo, a infiltração marginal (CARRILHO *et al.*, 2007; CARRILHO *et al.*, 2009). Quando isso ocorre há exposição de fibrilas de colágeno que são degradadas pelas MMPs prejudicando assim a adesão dos sistemas adesivos ao longo do tempo (CARRILHO *et al.*, 2007; CARRILHO *et al.*, 2009).

1.2 Justificativa

Pelo já exposto, é possível verificar que na literatura muito pouco é abordado a respeito de citotoxicidade, genotoxicidade, potencial inibitório de metaloproteinases, bem como o grau de conversão dos monômeros di-metacrilatos surfactantes: Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, PEG 400, PEG 1000, PEG 400 UDMA. Aliado a isso, diversos trabalhos têm demonstrado o efeito citotóxico do HEMA presente em diferentes sistemas adesivos sobre diversos tecidos bucais (DAHL, 2007; FALCONI *et al.*, 2007; LANZA *et al.*, 2009). Desta forma, há necessidade de serem obtidos adesivos odontológicos com melhores propriedades biológicas que os atualmente empregados.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Testar a biocompatibilidade de monômeros dimetacrilatos surfactantes de alto peso molecular tanto individualmente, como em formulações de adesivos autocondicionantes experimentais, bem como o efeito desses monômeros sobre as metaloproteinases 2 e 9.

1.3.2 Objetivos específicos

Testar a citotoxicidade dos monômeros Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, PEG 400 UDMA, PEG 400 e PEG 1000 por meio de cultura de odontoblastos MDPC - 23, bem como testar cada um destes na formulação de um sistema adesivo experimental autocondicionante.

Testar a genotoxicidade, dos monômeros Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, PEG 400 UDMA, PEG 400 e PEG 1000, bem como testar cada um destes na formulação de sistemas adesivos experimentais autocondicionantes.

Testar se existe ou não capacidade de algum dos monômeros supracitados de inibir a atividade de MMP-2 e MMP-9.

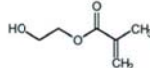
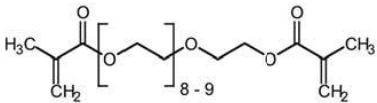
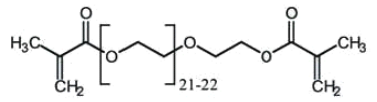
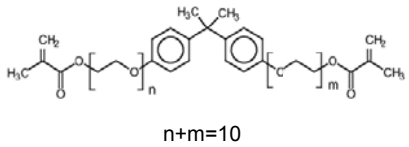
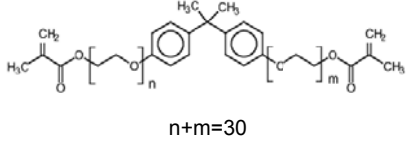
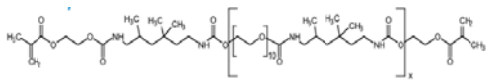
Avaliar o grau de conversão e cinética de reação polimérica dos adesivos autocondicionantes experimentais desenvolvidos.

1.4 Materiais e métodos

1.4.1 Desenvolvimento dos sistemas adesivos autocondicionantes experimentais

Seis sistemas adesivos autocondicionantes experimentais de dois passos serão formulados variando o tipo de monômero metacrilato empregado como surfactante. PEG 400 (P400), PEG 1000 (P1000), Bis-EMA 10 (B10), Bis-EMA 30 (B30) e PEG 400 UDMA (P400U) (tabela 1) corresponderão aos sistemas experimentais livre de HEMA, enquanto AH, contendo HEMA, será empregado como grupo controle. A composição dos *primers* e das resinas de cobertura correspondente a cada sistema estão descritos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1. Peso, fórmula e estrutura molecular de diferentes monômeros empregados nas formulações adesivas

Monômero	Peso Molecular	Fórmula molecular	Estrutura Molecular
2-hidroxietil metacrilato (HEMA)	130	$C_6 H_{10} O_3$	
Polietilenoglicol di-metacrilato 400 (PEGDMA 400)	550-594	$C_{26-28} H_{46-50} O_{12-13}$	
Polietilenoglicol di-metacrilato 1000 (PEGDMA 1000)	1124-1168	$C_{52-54} H_{98-102} O_{25-26}$	
Bisfenol A di-metacrilato etoxilado (Bis-EMA 10)	805	$C_{43} H_{64} O_{14}$	 n+m=10
Bisfenol A di-metacrilato etoxilado (Bis-EMA 30)	1686	$C_{83} H_{144} O_{34}$	 n+m=30
Polietilenoglicol 400 uretano di-metacrilato extendido (PEG 400 UDMA)	1139	$C_{54} H_{98} N_4 O_{21} (x=1)$	

*Dados fornecidos pela Esstech, Inc. Essington, PA, USA.

Tabela 2. Composição dos *primers* autocondicionantes contendo diferentes monômeros surfactantes

Primers	Monômero Surfactante	Composição (% em massa: p/v)			
		Surfactante	Etanol	Água	GDMA-P*
P400	PEG 400	30	20	20	30
P1000	PEG 1000	30	20	20	30
B10	Bis-EMA 10	30	20	20	30
B30	Bis-EMA 30	30	20	20	30
UP400	PEG 400 UDMA	30	20	20	30
AH	HEMA	30	20	20	30

* GDMA-P: é uma mistura equimolar de glicerol tetrametacrilato fosforado e glicerol dimetacrilato fosforado, produzido de acordo com estudo prévio (LIMA *et al.*, 2008).

Tabela 3. Composição das resinas de cobertura contendo diferentes monômeros surfactantes

Resina de Cobertura	Monômero Surfactante	Composição (% em massa: p/v)					
		Surfactante	*Bis-GMA	*TEGDMA	*CQ	*EDAB	*DPI
P400	PEG 400	25	49	23,8	0,4	0,8	1
P1000	PEG 1000	25	49	23,8	0,4	0,8	1
B10	Bis-EMA 10	25	49	23,8	0,4	0,8	1
B30	Bis-EMA 30	25	49	23,8	0,4	0,8	1
UP400	PEG 400 UDMA	25	49	23,8	0,4	0,8	1
AH	HEMA	25	49	23,8	0,4	0,8	1

*Bis-GMA: bisfenol A glicil di-metacrilato; TEGDMA: trietilenoglicil di-metacrilato; CQ: canforoquinona; EDAB: etil 4-dimetilamino benzoato; DPI: difenil iodônio hexafluorofosfato.

Obs.: CQ, EDAB e DPI são calculados em função da massa total.

Todos os materiais serão formulados através do cálculo de percentual em massa (p/v) dos componentes.

A formulação dos adesivos será realizada empregando uma balança analítica de precisão (AG 200, Gehaka Indústria e Comércio Eletro Eletrônica, São Paulo, SP, Brasil). Todos os componentes serão misturados manualmente de forma intensiva e posteriormente homogeneizados por 15min em cuba ultrassônica (CBU 100/ 1LDG,

Plana, São Paulo, SP, Brasil). Logo após, serão armazenados em recipientes hermeticamente isolados de luz e umidade por 24h para eliminação de bolhas.

1.4.2 Teste de citotoxicidade

Para análise do grau de citotoxicidade será feito teste *in vitro* por meio de cultivo celular. Para esta finalidade será empregada uma linhagem celular imortalizada de odontoblastos MDPC-23 (Mouse Dental Papillae Cell), já que os primeiros efeitos tóxicos *in vivo* ocorrem nos odontoblastos (ARANHA *et al.*, 2006). Além disso, MDPC-23 apresenta características dos odontoblastos vivos presentes nos dentes (HANKS *et al.*, 1998).

O meio de cultura celular utilizado será o meio Essencial de Eagle Modificado por Dubelcco's (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de L-glutamina, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100mg/mL). Em cada poço teste de uma placa de 96 poços serão colocados 2×10^4 células em 200µL de DMEM mais SFB. A placa será incubada em uma estufa de CO₂ com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO₂ por 24h de forma a permitir a adesão das células no fundo da placa de cultivo.

1.4.2.1. Análise da citotoxicidade: Ensaio MTT

O ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) será utilizado para avaliar a capacidade das células viáveis em reduzir metabolicamente o MTT por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica num cristal de formazan de cor azul-púrpura que se acumula no citoplasma celular.

Depois da incubação das placas por 24h duas análises serão feitas: uma com os monômeros puros (A) e outra com os adesivos correspondentes aos grupos experimentais polimerizados na forma de pastilhas (B).

Para a análise A removemos o meio e preparamos a solução de estoque através do peso molecular dos monômeros (Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, PEG 400 UDMA, PEG 400, PEG 1000 e HEMA) e, a partir dessa, as diluições correspondentes para cada monômero (figura 1).

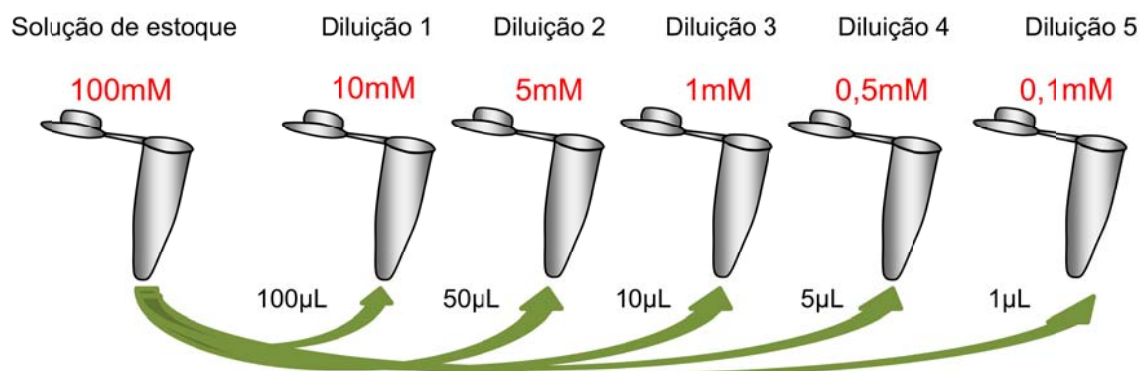


Figura 1: solução de estoque e diluições dos monômeros.

Para a análise B os adesivos contendo os diferentes monômeros, que serão confeccionados de acordo com o item 4.1, serão colocados em moldes circulares, de 5mm de diâmetro e 1mm de altura, cobertos com tiras de poliéster e fotoativados por 20seg obtendo-se assim pastilhas. Essas pastilhas serão incubadas a 37°C por 24h em DMEM. Esse meio então será utilizado para a análise de citotoxicidade.

Para ambas as análises A e B serão feitas de cada grupo quatro réplicas. Todo o experimento será repetido totalizando assim, $n=8$. Essas soluções serão colocadas na placa para nova incubação das células.

Após o período de 24h, o meio será removido de cada poço e serão adicionados 180µL de DMEM adicionado de 20µL de solução de MTT (5mg/mL de DMEM) em cada poço teste. As placas serão incubadas novamente por 24h de forma a permitir o metabolismo do MTT. Passado o período, o meio será sugado e os cristais de formazan serão ressuspensos em 200µL de dimetil sulfóxido (DMSO), com o auxílio de um agitador (150rpm por 5min).

Os resultados serão lidos em um espectrofotômetro (Thermoplate) com um comprimento de onda de 540nm, onde serão considerados os valores de absorbância como indicadores da viabilidade celular. Os dados então serão submetidos ao teste de ANOVA (análise de variância) e teste complementar de Tukey ($p \leq 0,05$).

1.4.3 Teste de genotoxicidade por micronúcleos

Para o teste de genotoxicidade as células serão cultivadas e distribuídas da mesma forma relatada anteriormente. No entanto, lamínulas de vidro de 2,5X2mm serão utilizadas no fundo das placas de 96 poços para permitir que as células

cresçam aderidas às lamínulas. Assim, a manipulação e processamento das células será facilitado como relatado a seguir.

Duas análises serão feitas: uma com os monômeros puros (A) e outra com os adesivos correspondentes aos grupos experimentais polimerizados na forma de pastilhas (B), como descrito no item anterior.

Após o contato com os materiais teste as lamínulas serão lavadas com PBS por 10s. Posteriormente as lamínulas serão coradas pela Técnica de Feulgen. Esta consiste na fixação das células através da oxidação em solução de ácido clorídrico 1N e posterior coloração com reagente de Schiff² e corante Fast Green³. Para isso, cada lamínula será fixada em solução álcool/éter (3/1). Após, as células sofrerão lise através da oxidação em solução de ácido clorídrico 1N a temperatura ambiente por 1min. Serão escorridas e imersas pela segunda vez em ácido clorídrico 1N, mas desta vez por 10min em estufa em temperatura de 63°C. Após as lamínulas serem esfriadas por 10min a temperatura ambiente, cada uma será novamente imersa em ácido clorídrico por 5min e seguidamente lavadas em água destilada, sendo duas passagens de 5min em água para cada lamínula.

Depois de secas, a temperatura ambiente, as lamínulas serão coradas com o reagente de Schiff, ficando imersas no corante por um período de 2h e 30min a temperatura ambiente, em ambiente escuro. Logo após, o reagente será removido e as lamínulas serão cobertas por água destilada tamponada por 1min. Após será realizada uma última lavagem em água destilada para logo depois serem secas por um período de 24h quando cada lamínula será imersa no corante Fast Green por 10s, seguido de 3 lavagens repetidas em álcool de 10s cada.

As lamínulas serão montadas em lâminas de vidro com Entelan (Merck KGaA, Alemanha). Os micronúcleos serão visualizados em microscópio óptico comum, com objetiva de 40X e oculares de 10X. Antes de iniciar a contagem de MN, cada lâmina será codificada de forma a cegar a observação do avaliador.

Os critérios utilizados para caracterizar a formação dos micronúcleos serão os mesmos utilizados e relatados anteriormente (COUNTRYMAN, HEDDLE, 1976): 1) presença de material nuclear; 2) ter intensidade de luz maior ou igual à do núcleo; 3)

² Schiff: ácido periódico de Schiff (usado para colorir estruturas que contenham elevado teor de carboidratos, especialmente glicogênio, dentre outros produzindo coloração púrpura-magenta.

³ É usado como um corante quantitativo para histonas em pH alcalino após extração ácida de DNA.

ter forma circular ou oval; 4) possuir área menor do que 1/5 do núcleo; 5) estar completamente separado do núcleo.

1.4.4 Análise da capacidade inibitória de MMPs dos monômeros surfactantes

A atividade proteolítica de cada monômero será examinada em gel de poliacrilamida a 10% contendo 0,05% de gelatina. O meio condicionado pelas MMPs obtido através da saliva humana (MAKELA *et al.*, 1994) será misturado ao tampão de amostra (2% SDS; 125mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol) e então a eletroforese será realizada. O gel será incubado em tampão de revelação que conterá os monômeros utilizados no estudo (bis-EMA 10, bis-EMA 30, PEG 400 UDMA, PEG 400 e PEG 1000) em duas concentrações: de 10mM e 5mM. Será utilizado como controle positivo 0,5% de N-etil-maleimida (NEM) que não inibe a atividade das metaloproteinases, como controle negativo será utilizado 0,5% de EDTA que é um conhecido inibidor das metaloproteinases e também um controle contendo apenas a solução tampão (Tris-CaCl₂) sem nenhum grupo teste.

Após a eletroforese, o gel será lavado duas vezes em Triton X-100 (2%) por 60min a temperatura ambiente e então incubado a 37°C por 24h em tampão 50mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 5 mM CaCl₂ (Tris-CaCl₂). Após a incubação, os géis serão corados com Azul de Coomassie G-250 a 0,05% (Bio Rad, Richmond, CA). A atividade gelatinolítica será detectada como bandas não coradas no gel que ficará corado em azul.

Após será feita a análise semi-quantitativa das bandas para quantificar a inibição das MMPs pelas diferentes concentrações dos diferentes monômeros utilizados, as bandas serão escaneadas e os valores de transmitância obtidos serão analisados usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). Se for demonstrado algum grau de inibição de alguma das substâncias testes, os dados serão plotados e submetidos à regressão linear.

1.4.5 Análise da cinética de conversão dos adesivos experimentais

A cinética de conversão dos polímeros será avaliada por meio de um espectrofotômetro infravermelho com Transformada de Fourier (RT-FTIR Shimadzu Prestige21 Spectrometer, Shimadzu, Japão) equipado com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR), composto por um cristal horizontal de seleneto de zinco (ZnSe), com espelhos de angulação de 45° (PIKE Technologies, WI, USA). Um suporte será acoplado para a fixação da unidade fotoativadora ao espectrofotômetro, permitindo a padronização de uma distância de 5mm entre a extremidade da ponteira de fibra ótica e a amostra. Cada amostra será dispensada diretamente no cristal de ZnSe em pequenas gotas (~3µl) e fotoativadas por 20s. Cada adesivo experimental será analisado em triplicata. Para o monitoramento de varredura será utilizado o software IRSolution, em uma faixa espectral entre 1750 e 1550cm⁻¹, resolução de 8 cm⁻¹ e velocidade de deslocamento de espelho de 2,8mm/s. Com esta configuração será possível obter um espectro por segundo durante a fotoativação. A análise será realizada em ambiente com temperatura controlada de 23°C e umidade relativa de <60%.

O grau de conversão em função do tempo será calculado considerando a intensidade da vibração do tipo estiramento da dupla ligação carbono-carbono na frequência de 1635cm⁻¹. O estiramento simétrico do anel aromático em 1610cm⁻¹ das amostras polimerizadas e não polimerizadas será utilizado como padrão interno.

1.5 Referências

- ARANHA, A. M.; GIRO, E. M.; SOUZA, P. P.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. **Dental Materials**, v.22, n.9, p.864-9, 2006.
- BROWNE, R. M. Animal tests for biocompatibility of dental materials--relevance, advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, v.22 Suppl 2, p.S21-4, 1994.
- CARRILHO, M. R.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M. F.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; REIS, A. F.; HEBLING, J.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v.86, n.6, p.529-33, 2007.
- CARRILHO, M. R.; TAY, F. R.; DONNELLY, A. M.; AGEE, K. A.; TJADERHANE, L.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; FOULGER, S.; PASHLEY, D. H. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v.90, n.1, p.373-80, 2009.
- CARVALHO, R. V.; OGLIARI, F. A.; DE SOUZA, A. P.; SILVA, A. F.; PETZHOLD, C. L.; LINE, S. R.; PIVA, E.; ETGES, A. 2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2. **European Journal of Oral Sciences**, v.117, n.1, p.64-7, 2009.
- COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v.41, n.2-3, p.321-32, 1976.
- DAHL, J. E. Potential of dental adhesives to induce mucosal irritation evaluated by the HET-CAM method. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.65, n.5, p.275-283, 2007.
- DURNER, J.; KREPPEL, H.; ZASPEL, J.; SCHWEIKL, H.; HICKEL, R.; REICHL, F. X. The toxicokinetics and distribution of 2-hydroxyethyl methacrylate in mice. **Biomaterials**, v.30, n.11, p.2066-71, 2009.
- FALCONI, M.; TETI, G.; ZAGO, M.; PELOTTI, S.; BRESCHI, L.; MAZZOTTI, G. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. **Cell Biology and Toxicology**, v.23, n.5, p.313-322, 2007.
- FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v.17, n.4-5, p.213-30, 2001.
- FURUKAWA, M.; SHIGETANI, Y.; FINGER, W. J.; HOFFMANN, M.; KANEHIRA, M.; ENDO, T.; KOMATSU, M. All-in-one self-etch model adhesives: HEMA-free and without phase separation. **Journal of Dentistry**, v.36, n.6, p.402-8, 2008.

HANKS, C. T.; SUN, Z. L.; FANG, D. N.; EDWARDS, C. A.; WATAHA, J. C.; RITCHIE, H. H.; BUTLER, W. T. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. **Connective Tissue Research**, v.37, n.3-4, p.233-49, 1998.

HIRAISHI, N.; BRESCHI, L.; PRATI, C.; FERRARI, M.; TAGAMI, J.; KING, N. M. Technique sensitivity associated with air-drying of HEMA-free, single-bottle, one-step self-etch adhesives. **Dental Materials**, v.23, n.4, p.498-505, 2007.

HUANG, F. M.; CHOU, M. Y.; CHANG, Y. C. Dentin bonding agents induce c-fos and c-jun protooncogenes expression in human gingival fibroblasts. **Biomaterials**, v.24, n.1, p.157-63, 2003.

IKEMURA, K.; ICHIZAWA, K.; ENDO, T. Design of a new self-etching HEMA-free adhesive. **Dental Materials**, v.28, n.5, p.558-64, 2009.

IRELAND, A. J.; IRELAND, M. J.; SHERRIFF, M. Surfactants as part of a combined etchant and activator solution prior to the use of an anaerobic adhesive. **Dental Materials**, v.20, n.10, p.924-30, 2004.

KOSTORYZ, E. L.; DHARMALA, K.; YE, Q.; WANG, Y.; HUBER, J.; PARK, J. G.; SNIDER, G.; KATZ, J. L.; SPENCER, P. Enzymatic biodegradation of HEMA/bisGMA adhesives formulated with different water content. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v.88, n.2, p.394-401, 2009.

LANZA, C. R.; DE SOUZA COSTA, C. A.; FURLAN, M.; ALECIO, A.; HEBLING, J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. **Cell Biology and Toxicology**, v.25, n.6, p.533-43, 2009.

LIMA, G.D.A., S.; OGLIARI, F. A.; DA SILVA, E. O.; ELY, C.; DEMARCO, F. F.; CARRENO, N. L.; PETZOLD, C. L.; PIVA, E. Influence of water concentration in an experimental self-etching primer on the bond strength to dentin. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v.10, n.3, p.167-72, 2008.

MAKELA, M.; SALO, T.; UITTO, V. J.; LARJAVA, H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. **Journal of Dental Research**, v.73, n.8, p.1397-406, 1994.

OGLIARI, F. A.; ELY, C.; ZANCHI, C. H.; FORTES, C. B.; SAMUEL, S. M.; DEMARCO, F. F.; PETZOLD, C. L.; PIVA, E. Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. **Dental Materials**, v.24, n.2, p.165-71, 2008.

PAWLOWSKA, E.; POPLAWSKI, T.; KSIAZEK, D.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. **Mutation Research**, v.629, n.2, p.122-9, 2010.

POPLAWSKI, T.; PAWLOWSKA, E.; WISNIEWSKA-JAROSINSKA, M.; KSIAZEK, D.; WOZNIAK, K.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Cytotoxicity and genotoxicity of glycidyl methacrylate. **Chemico-Biological Interactions**, v.180, n.1, p.69-78, 2009.

RENO, F.; TRAINA, V.; CANNAS, M. Adsorption of matrix metalloproteinases onto biomedical polymers: a new aspect in biological acceptance. **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**, v.19, n.1, p.19-29, 2008.

SANTOS, J.; CARRILHO, M.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; PASHLEY, D.; TAY, F.; FERRAZ, C.; TJADERHANE, L. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. **Journal of Endodontics**, v.35, n.5, p.686-9, 2009.

SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **Journal of Dental Research**, v.85, n.10, p.870-7, 2006.

TORKABADI, S.; NAKAJIMA, M.; IKEDA, M.; FOXTON, R. M.; TAGAMI, J. Bonding durability of HEMA-free and HEMA-containing one-step adhesives to dentine surrounded by bonded enamel. **Journal of Dentistry**, v.36, n.1, p.80-6, 2008.

VAN LANDUYT, K. L.; SNAUWAERT, J.; PEUMANS, M.; DE MUNCK, J.; LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBEEK, B. The role of HEMA in one-step self-etch adhesives. **Dental Materials**, v.24, n.10, p.1412-9, 2008.

WALTHER, U. I.; WALTHER, S. C.; LIEBL, B.; REICHL, F. X.; KEHE, K.; NILIUS, M.; HICKEL, R. Cytotoxicity of ingredients of various dental materials and related compounds in L2- and A549 cells. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.63, n.5, p.643-9, 2002.

ZANCHI, C. H.; ELISEU, A. M.; OGLIARI, F. A.; CHERSONI, S.; PRATI, C.; DEMARCO, F. F.; PIVA, E. A new approach in self-etching adhesive formulations: replacing HEMA for surfactant dimethacrylate monomers. **Dental Materials**, v.-, n.-, p.In process of submission, 2010.

1.6 Aspectos éticos

Tendo em vista que o presente trabalho fará uso de linhagem celular imortalizada e não de uma cultura primária, o presente projeto não será apreciado pelo comitê de ética, pois não há riscos diretos ou indiretos a pessoas ou animais.

1.8 Orçamento

Descrição	Quantidade	Custo (unidade)	Custo (total)
Ácido acético, Synty	10L	R\$ 20,00	R\$ 200,00
Agitador de gel basculante, Arsec	1	R\$ 1408,00	R\$ 1408,00
Água ultrapura	5L	R\$ 204,60	R\$ 2046,00
Álcool metílico P.A., Synth	10L	R\$ 12,48	R\$ 124,80
Acrilamida, Vetec	1 frasco	R\$ 103,73	R\$ 103,73
Bis-EMA 10	500 g	R\$ 350,00	R\$ 350,00
Bis-EMA 30	500 g	R\$ 350,00	R\$ 350,00
Bis-GMA	500 g	R\$ 350,00	R\$ 350,00
Marcador de peso molecular, Plus DNA Ladder	1	R\$ 984,50	R\$ 984,50
Câmara de Neubauer espelhada	1	R\$ 141,79	R\$ 141,79
Canforoquinona	10g	R\$ 410,00	R\$ 410,00
Células MDPC-23	1 garrafa	R\$ 1800,00	R\$ 1800,00
Clearfil SE Bond – Kuraray	1 kit	R\$ 420,00	R\$ 420,00
DMEM, Gibco	2 cx.	R\$ 300,00	R\$ 600,00
DMSO P.A., Vetec	1 L	R\$ 50,93	R\$ 50,93
EDAB	10g.	R\$ 300,00	R\$ 300,00
Filtros 0,22µm, Millex	1 cx.	R\$ 243,32	R\$ 243,32
Garrafas de cultivo, TPP	5 pct.	R\$ 17,58	R\$ 87,90
HEMA	500 g	R\$ 350,00	R\$ 350,00
Luvras para procedimento	1 cx.	R\$ 18,00	R\$ 18,00
Máscaras descartáveis	1 cx.	R\$ 10,00	R\$ 10,00
Microtubo para centrifuga tipo Eppendorf, Cral	1 pct.	R\$ 18,15	R\$ 18,15
PBS, Gibco	1 frasco	R\$ 176,00	R\$ 176,00
PEGDMA 400	500 g	R\$ 350,00	R\$ 350,00
PEGDMA 1000	500 g	R\$ 350,00	R\$ 350,00
PEG 400 UDMA	500 g	R\$ 350,00	R\$ 350,00
Persulfato de amônia, Vetec	1 frasco	R\$ 14,74	R\$ 14,74

Placa de Elisa de 96 poços, TPP	50	R\$ 4,36	R\$ 218,35
Pipeta multicanal 8 canais, HTL	1	R\$ 764,50	R\$ 764,50
Ponteiras de 200µl, Axygen	1 pct.	R\$ 35,86	R\$ 35,86
Ponteiras de 1000µl, Axygen	1 pct	R\$ 38,60	R\$ 38,60
Soro fetal bovino, Gibco	1 frasco	R\$ 346,50	R\$ 346,50
TEGDMA	500 g	R\$ 350,00	R\$ 350,00
Tubo tipo Falcon 50 ml, Cral	3 pct.	R\$ 14,08	R\$ 42,24
Tubo tipo Falcon 15 ml, Cral	3 pct.	R\$ 26,07	R\$ 78,21
Tubo para criogenia, TPP	1 pct.	R\$ 69,52	R\$ 69,52
Tripsina, Gibco	1 frasco	R\$ 288,86	R\$ 288,86
Incubadora shaker modelo SP-222, labor	1	R\$ 6.930,00	R\$ 6.930,00
Serviço de revisão do inglês e gastos com envio pra publicação	-	R\$ 1000,00	R\$ 1000,00
		Total	R\$ 21.770,50

2 RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

Quanto a alterações na metodologia e resultados do projeto:

O projeto de dissertação que inicialmente foi qualificado juntamente ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia consistia na realização de outras metodologias, conforme descrito no projeto em anexo.

Assim, o teste de citotoxicidade dos monômeros não consta nos resultados finais desta dissertação, tendo em vista que os resultados preliminares obtidos não foram precisos. Desta forma, seria necessária a sua repetição e esta não foi possível devido o fato de eu não possuir tempo disponível para conseguir defender a dissertação no prazo estabelecido pelo Programa devido a minhas atividades profissionais exercidas no momento.

Nos resultados da genotoxicidade houve a sobreposição de células, sendo necessário então repetir o experimento fazendo uma melhor homogeneização das células, o que não foi possível devido, também, ao tempo hábil disponível.

A metodologia da zimografia foi realizada e obtivemos resultados conclusivos. Entretanto, não foi inserida junto ao trabalho, pois decidimos inserir estes resultados juntamente com os resultados de citotoxicidade dos monômeros puros, conforme explicitado no primeiro parágrafo deste.

Quanto à metodologia de cinética de conversão, não foi possível a sua realização devido a impossibilidade de utilização do espectrofotômetro infravermelho para esse fim.

Foi incluída na dissertação a metodologia de citotoxicidade do primer, que não havia no projeto inicial, para um maior enriquecimento do trabalho.

Não foi possível a utilização de células MDPC-23 (odontoblastos) devido à impossibilidade de liberação da importação dessas células.

A estatística realizada, diferentemente do projeto, foi o teste ANOVA (análise de variância), mas como o teste foi não paramétrico fizemos o teste complementar de Dunn.

Perspectivas Futuras:

Em conclusão, decidimos realizar a defesa considerando a formulação dos sistemas adesivos livres de HEMA, cujo os resultados julgamos relevantes para a pesquisa científica. Posteriormente, repetiremos a metodologia da citotoxicidade dos monômeros dimetacrilatos puros para obtenção de resultados conclusivos, os quais

possam juntamente com os achados da zimografia e genotoxicidade comporem outro artigo para publicação.

O presente artigo da dissertação será enviado para a revista *Clinical Oral Investigation*.

3 ARTIGO

ORIGINAL RESEARCH

Title: **Biocompatibility of experimental self-etching HEMA-free adhesive systems**

Marília Oliveira Barbosa, Post-Graduate Program, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

*Adriana Fernandes da Silva, DDS, MSc, PhD, Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Rodrigo Varella de Carvalho, DDS, MSc, PhD, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, University of North Parana, Londrina, PR, Brazil.

Flávio Fernando Demarco, DDS, PhD, Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Cesar Henrique Zanchi, DDS, MSc, PhD, Department of Social and Preventive Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

Fabrizio Aulo Ogliari, DDS, MSc, PhD, Technological Development Center, School of Materials Engineering, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Evandro Piva, DDS, MSc, PhD, Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil

* Reprint Request: Adriana Fernandes da Silva, Rua Gonçalves Chaves 457 sala 504, Centro, Pelotas-RS, Zip Code 96015560, phone/fax: +55 53 32226690 r. 135, e-mail: adriana@ufpel.edu.br

ABSTRACT

HEMA is a widely used monomer in the adhesive systems, although the biologic performance has been considered negative, this problem has been tried to be solved by testing new monomers with lower citotoxic potential. We analyzed the biocompatibility of five experimental dimethacrylate monomers: Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, PEG 400, PEG 400 UDMA, PEG 1000. First, an *in vitro* test was made by using 3T3 mouse fibroblast cell culture. So, the cytotoxic test was made using primers at 20% and 2%. The dilutions were maintained in contact with the cells for a period of 24h and after the survival of these cells photometrically verification using MTT assay was made. After it, a cytotoxic test was performed with the resin bonds as follows: these monomers were polymerized and left in immersion in DMEM for 24h and later the eluate obtained was inserted on the 3T3 cell for 24h. The statistical analysis was performed by Kruskal wallis method, followed by a multiple-comparison Dunn's test ($p < 0.05$). Second, the degree of conversion of adhesive resin was also analyzed. The results showed that related to the primers in the concentration of 2% only PEG 1000 group had no statistical difference with the control group. In the concentration of 20% there was no difference among Bis-EMA 10, PEG 1000 and the control group. Concerning to eluates, there were no differences among Bis-EMA 10, PEG 400 UDMA and the control group. All monomers showed a degree of conversion similar to HEMA. Other studies are necessary using different concentrations and different cell lines because these monomers are promising in the use of adhesive systems.

Keywords: cytotoxicity test, monomer, HEMA, degree of conversion, adhesive systems.

INTRODUCTION

2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) is a monomer used in most current dental adhesives due to its inherent polarity that efficiently allows the infiltration of the partially demineralized dentin [1]. HEMA is a methacrylate monomer that when polymerized is converted into solid material, but if it is not fully converted, this monomer can be free and released into the oral cavity and reach, over the dentinal tubules, the pulp. So it can cause cellular damage and also reach the blood vessels [2-4]. And also a lack of polymerization, a decrease in dentin thickness and a long time of expose can help this process [5]. As well, it is even possible that these monomers originated from the adhesives may remain in direct contact with the collagen network exposed by etching, even after the curing of the adhesive system [6] and , these monomers can be released during the process of material degradation [3,7].

Thus, although the HEMA still widely used in dentistry, many studies have shown that this methacrylate monomer has a significant cytotoxic effect [2,8-11]. The concentrations of HEMA available for the diffusion through dentin can vary between 1,5 to 8mM and these concentrations can easily reach the pulp and consequently cause adverse effects as modification of the normal inflammatory response [4,12].

In view of these problems HEMA-free adhesives has been developed [13-16], between some possibilities we can emphasize the dimethacrylate surfactants monomers, which exhibit different chain lengths, all of them larger than the molecule of HEMA. Therefore, they can be an alternative in the control of the properties of dental materials [17]. Recently, in dentistry, two-step self-etching adhesive formulation new containing certain types of surfactant monomers has been

suggested. Previous *in vitro* results showed that these adhesives showed satisfactory mechanical results [18]. They were compared with adhesives containing HEMA in microtensile tests and the performance of both was similar. On the other hand, regarding to biological aspects there is nothing evaluated.

These dimethacrylate monomers have different chain lengths and may be a viable alternative to control the properties of dental materials [17] (Fig. 1). Among these monomers, Bis-EMA (ethoxylated bisphenol A diglycidyl dimethacrylate) has been used, which is analogous to the Bis-GMA (2,2-bis[4-(2-hydroxy-3-methacryloyloxypropyl)phenyl]-propane) molecule, however it is less viscous and has presented as a potential reagent to form a large number of dental products, like adhesives, nowadays being marketed by chemical manufacturers [17]. This monomer was investigated in relation to the bond strength and structural reliability showing a satisfactory performance and then presenting potential use in adhesive systems [19].

Thus, an important requirement to be considered on the commercially available dental adhesives is the biocompatibility [20]. This should be taken into account since the adhesives often remain in close contact with dental tissues for a long period of time, and also should not induce inflammatory or immune response [10]. Therefore, the potential of the harmful effects of these materials is a relevant propriety to be measured because this may result in cell death and mutations [4].

Based on the above, the aim of this study was to test the cytotoxicity properties of five experimental self-etching adhesive systems when compared to HEMA. As well, the degree of polymeric conversion of the experimental adhesives developed was assessed.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All monomers were supplied by Esstech (Essington, PA, USA). Cell culture medium and reagents were obtained from GIBCO (Grand Island, NY, USA).

The monomers used were: 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), ethoxylated bisphenol A diglycidyl dimethacrylate, with 10 and 30 ethylene oxide units (Bis-EMA 10 and Bis-EMA 30, respectively), poly-ethyleneglycol (400) dimethacrylate (PEG 400), poly-ethyleneglycol (1000) dimethacrylate (PEG 1000), poly-ethyleneglycol (400) extended urethane dimethacrylate (PEG 400 UDMA).

Development of experimental self-etching adhesive systems

Six experimental two step self etching adhesive systems were formulated by varying the type of methacrylate monomer used as a surfactant. Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, PEG 400, PEG 400 UDMA and PEG 1000 correspond to the experimental HEMA-free systems, while an HEMA-containing adhesive was used as a control group. The composition of the experimental primers is described in table 1.

The formulation of adhesives was performed by using an analytical balance (AG 200, Gehaka Electric and Electronic Industry and Commerce, Sao Paulo, Brazil). All components were mixed manually and subsequently homogenized for 15 minutes in an ultrasonic tank (100 CBU / 1LDG, Flat, Sao Paulo, Brazil). Soon after, they were stored in hermetically closed flasks isolated from light and moisture for 24 hours to eliminate bubbles. The composition of the experimental resin bonds is described in table 2.

Cell culture

The cell culture medium was DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Mouse fibroblasts of the 3T3 immortalized cell line were maintained as a stock culture in DMEM medium and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air until subconfluency.

Cytotoxicity Assay (MTT Assay)

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) was used to assess cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity. Mouse fibroblasts 3T3 (1 × 10⁴/well) were maintained in DMEM medium in 96-well plates for 24h. After this incubation, medium was removed and two different tests were made.

In the first, one drop of the primer was mixed in the stock solution that was prepared by molecular weight of the monomers (Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, PEG 400, PEG 400 UDMA PEG 1000 and HEMA) and, from this, the corresponding dilutions for each monomer. Two dilutions were made, the first dilution was 20% and the second 2%.

To evaluate the cytotoxicity of the experimental primers (table 1) two dilutions (2 and 20%) were prepared in cell culture medium. To evaluate the cytotoxicity of the experimental resin bonds (table 2) they were poured into sterile circular Teflon molds (5 mm diameter and 1 mm depth), covered with a mylar strip, and photo-activated for 20s at room temperature. Specimens were preincubated with 1 mL of DMEM at 37°C, pH 7.2 for 24 h for each specimen, under static conditions. The extracts were

filtered through 0.22-mm cellulose acetate filters and used for cytotoxicity experiments.

The cytotoxicity produced by different groups was assessed at 24h cell exposure time. After removing the monomers, 200 μ L of medium added to 20 μ L of MTT solution (5 mg of MTT/mL PBS) were well added to each one. After 4h of incubation at 37°C in darkness the blue formazan precipitate was extracted from the mitochondria using 200 μ L/well dimethyl sulfoxide (DMSO) on a shaker for 5 minutes at 150 rpm. The absorption was determined spectrophotometrically at 540 nm.

Each assay was done in quadruplicate and was repeated at least twice.

Statistical Analysis

The cell viability data (absorbance) were analyzed using the program SigmaStat 3.5 (SPSS, Chicago, IL, USA). The statistical analysis was performed by non-parametric test Kruskal Wallis one-way analysis of variance by ranks (ANOVA) followed by a multiple-comparison Dunn's test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Analysis of the degree of conversion of experimental adhesives

Degree of conversion of polymers was evaluated by an infrared spectrophotometer with Fourier Transform (RT-FTIR Spectrometer Prestige21 Shimadzu, Shimadzu, Japan) equipped with an attenuated total reflectance (ATR), composed of a horizontal crystal of zinc selenide (ZnSe), and mirrors with an angle of 45° (PIKE Technologies, WI, USA). A support is coupled to the fixing of the curing unit to the spectrophotometer, allowing standardization of a distance of 5mm between the end of the fiber optic tip and sample. Each sample was dispensed

directly on the ZnSe crystal in droplets ($\sim 3\mu\text{l}$) and photoactivated for 20 seconds. Each adhesive was examined five times. For monitoring the scanning software it was used IRSolution in a spectral range between 1800 and 1500cm^{-1} , resolution of 4 cm^{-1} and velocity of mirror of 2.8 mm / s . With this setup we obtained one spectrum before and one after the photo-activation. The analysis was performed in a controlled temperature environment of $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of $<60\%$.

The degree of conversion versus time was calculated considering the intensity of vibration-type stretching of carbon-carbon double bond in the frequency of 1635cm^{-1} . The symmetric stretching of aromatic ring at 1610cm^{-1} of the specimens cured and not cured will be used as internal standard.

RESULTS

Results of the cell viability for 24h using MTT assay:

- After cell contact for 24h with the primers 2 and 20%

In P2 (primer 2% group) there was reduction in cell viability in all tested experimental groups when compared to the negative control, where there were only fibroblasts cells and the medium DMEM (NC). In P2, all experimental groups showed difference statistically significant to NC, exception the PEG 1000 group ($p>0.05$). This group also showed less cytotoxic than Bis-EMA 30 and HEMA ($p<0.05$) (Fig. 2).

In P20 (primer 20% group) a reduction in cell viability in all tested experiment groups compared to NC was also noticed, but Bis-EMA 10 and PEG 1000 did not present statistic difference ($p<0.05$) (Fig. 3).

- After cell contact for 24h with the resin bonds (RB):

The results of the mitochondrial activity after cell contact with the extracts derived from resin bonds are reported in Fig. 4. In relation to them, all groups showed less cell viability compared to the NC, but Bis-EMA 10 and PEG 400 UDMA did not present statistic difference. However, between the experimental groups there were no differences ($p < 0.05$).

- Degree of conversion of the resin bonds:

The results of degree of conversion are showed in table 3. It is possible to realize that all experiment adhesives tested, especially the dimethacrylate monomers, had a degree of conversion similar to HEMA, which is the most used monomer in the adhesive systems nowadays.

DISCUSSION

HEMA is a small and hydrophilic monomer widely used in the adhesives systems and is also known as a toxic monomer, mainly because diffusing capacity. This phenomenon happens because it has small molecule weight which facilitates its penetration into tubules. When talking about biocompatibility molecular size it is very important to consider [21]. A study showed that among all components of a self-etching adhesive system the HEMA was the main diffused component [11]. Because of that we used five different dimethacrylate monomers with potential to replace HEMA in the formulation of adhesive systems. These monomers were tested in experimental self-etching adhesive formulations and these adhesives were

formulated identically, changing only the monomer tested. An advantage of the experimental dimethacrylate monomers would have bigger molecule weight than HEMA, and its diffusion through the dentin tubules until reaching the pulp would be more difficult, decreasing their toxic potential effect.

There is also the question of remaining dentin thickness. It influences and modifies the inflammatory pulp reaction. Smaller amount of dentin thickness increases the diffusion of the monomers through the pulp tissue [22]. Also, its better for avoiding the etching with phosphoric acid in deep cavities, so this problem can be minimized [23, 24].

Two different cytotoxicity tests were made and in all there was a decrease in cell viability compared with the control. In the primers, in the concentration of 2% only PEG 1000 did not have a statistical difference from the control, thus being the least toxic. And it also showed a statistical difference to HEMA, being less toxic than HEMA and also having much larger molecular weight (Fig. 1), which difficults the penetration through the dentinary tubules. All this shows that its use is a potential substitute to HEMA. In relation to the concentration of 20% only Bis-EMA 10 and PEG 1000 did not present statistical difference from the control, showing a potential use in bigger concentrations in adhesive systems. These two concentrations were used due the fact that it is a serial dilution and because it is closer to clinical procedure, because we believed that lower concentrations can diffuse thorough the dentinary tubules.

In analyzes of the eluates derived from the resin bonds polymerized, our results showed that Bis-EMA 10 and PEG 400 UDMA did not present statistical difference when compared to the control group and among the groups also there were no significant statistical differences although the most toxic monomer has been

the HEMA group. This should be taken into consideration because HEMA is the most used monomer in adhesive systems and has the greatest diffusion to the pulp, as well as it has the smaller molecule size.

We believed that the differences among the less toxic groups where no statistical differences were showed with the control group, as primers as resin bonds, it probably was due to the fact that these materials have different chemical components and the interaction among these components, plus the monomers with different molecular weight (Fig 1) result in unequally polymerized compounds. So, the fact that not even all monomers are converted in polymers during polymerization should be taken into account, especially because the molecule of HEMA is small and consequently it facilitates its diffusion [2-4]. One important analyze to considerer is the dentin permeability test. It should be valued once the most probable vantage would be the high molecular weight theses experimental monomers, which would not damage the pulp tissue.

Analysis of the degree of conversion is also important because it shows how these monomers respond when polymerized, what the percentage of monomers converted in polymers and as a result it can predicting the amount of free monomers which can be released and reach the pulp. In our research results the HEMA group (Table 3) showed similar performances with the literature [25, 26], on the other hand bis 10 and bis 30's groups performed results lower than the literature [17], still the percentage used between the study has been different. The others groups: P400, P400U and P1000 cannot be compared to literature once what its formulations were not evidenced, even if they showed similar performance among all groups used in this study. Finally, these experimental dimethacrylate monomers can be promising alternatives to requiring further mechanical and biological analyzes.

In this study trademark was not used because it is difficult to compare with other formulations where we can't confirm the compounds used as well the concentrations its described in the product label, furthermore, this and other studies have done comparisons using an own standardization which was developed in the laboratory [27, 28].

CONCLUSION

The present study showed that these dimethacrylate monomers have potential of use in formulations of adhesive systems. Besides, it was evidenced better performance of P1000, P400U, and Bis 10 in relation to control group as to toxicity, so, other studies are needed to explore their properties even if using different concentrations as *in vitro model* as *in vivo* (animal model).

ACKNOWLEDGES

Authors would like to thank Esstech Inc for reagents donations, CAPES/MEC (Brazilian Government) for scholarship and Danieli Oliveira Vilela for correcting the English language.

REFERENCES

1. Van Landuyt KL, Snauwaert J, Peumans M, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B (2008) The role of hema in one-step self-etch adhesives. *Dent Mater* 24:1412-1419
2. Pawlowska E, Poplawski T, Ksiazek D, Szczepanska J, Blasiak J (2010) Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. *Mutat Res*
3. Durner J, Kreppel H, Zaspel J, Schweikl H, Hickel R, Reichl FX (2009) The toxicokinetics and distribution of 2-hydroxyethyl methacrylate in mice. *Biomaterials* 30:2066-2071
4. Poplawski T, Pawlowska E, Wisniewska-Jarosinska M, Ksiazek D, Wozniak K, Szczepanska J, Blasiak J (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of glycidyl methacrylate. *Chem Biol Interact* 180:69-78
5. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J (1996) In vitro cytotoxicity and dentin permeability of hema. *J Endod* 22:244-248
6. Carvalho RV, Ogliari FA, de Souza AP, Silva AF, Petzhold CL, Line SR, Piva E, Etges A (2009) 2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Eur J Oral Sci* 117:64-67
7. Kostoryz EL, Dharmala K, Ye Q, Wang Y, Huber J, Park JG, Snider G, Katz JL, Spencer P (2009) Enzymatic biodegradation of hema/bisgma adhesives formulated with different water content. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 88:394-401
8. Falconi M, Teti G, Zago M, Pelotti S, Breschi L, Mazzotti G (2007) Effects of hema on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. *Cell Biol Toxicol* 23:313-322
9. Walther UI, Walther SC, Liebl B, Reichl FX, Kehe K, Nilius M, Hickel R (2002) Cytotoxicity of ingredients of various dental materials and related compounds in I2- and a549 cells. *J Biomed Mater Res* 63:643-649
10. Huang FM, Chou MY, Chang YC (2003) Dentin bonding agents induce c-fos and c-jun protooncogenes expression in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 24:157-163
11. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alecio A, Hebling J (2009) Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol* 25:533-543
12. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G (2006) Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 85:870-877
13. Hiraishi N, Breschi L, Prati C, Ferrari M, Tagami J, King NM (2007) Technique sensitivity associated with air-drying of hema-free, single-bottle, one-step self-etch adhesives. *Dent Mater* 23:498-505

14. Furukawa M, Shigetani Y, Finger WJ, Hoffmann M, Kanehira M, Endo T, Komatsu M (2008) All-in-one self-etch model adhesives: Hema-free and without phase separation. *J Dent* 36:402-408
15. Torkabadi S, Nakajima M, Ikeda M, Foxton RM, Tagami J (2008) Bonding durability of hema-free and hema-containing one-step adhesives to dentine surrounded by bonded enamel. *J Dent* 36:80-86
16. Ikemura K, Ichizawa K, Endo T (2009) Design of a new self-etching hema-free adhesive. *Dent Mater J* 28:558-564
17. Ogliari FA, Ely C, Zanchi CH, Fortes CB, Samuel SM, Demarco FF, Petzhold CL, Piva E (2008) Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. *Dent Mater* 24:165-171
18. Zanchi CH, Eliseu AM, Ogliari FA, Chersoni S, Prati C, demarco FF, Piva E: A new approach in self-etching adhesive formulations (2010) Replacing hema for surfactant dimethacrylate monomers. *Dent Mater* -In process of submission.
19. Zanchi CH, Munchow EA, Ogliari FA, Chersoni S, Prati C, Demarco FF, Piva E (2010) Development of experimental hema-free three-step adhesive system. *J Dent* 38:503-508
20. Browne RM (1994) Animal tests for biocompatibility of dental materials--relevance, advantages and limitations. *J Dent* 22 Suppl 2:S21-24
21. Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Kuboki T, Yoshida Y, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B (2008) Bonding effectiveness and interfacial characterization of a hema/tegDMA-free three-step etch&rinse adhesive. *J Dent* 36:767-773.
22. Hamid A, Hume WR (1997) The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. *J Oral Rehabil*;24:20-25.
23. Rathke A, Alt A, Gambin N, Haller B (2007) Dentin diffusion of hema released from etch-and-rinse and self-etch bonding systems. *Euro J of Oral Sciences*;115:510-516.
24. Cetinguc A, Olmez S, Vural N (2007) Hema diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. *Dent Mater*;23:302-307.
25. Conde MC, Zanchi CH, Rodrigues-Junior SA, Carreño NL, Ogliari FA, Piva E (2009) Nanofiller loading level: Influence on selected properties of an adhesive resin. *J Dent*;5:331-335.
26. Faria-e-Silva AL, Lima AF, Moraes RR, Piva E, Martins LR (2010) Degree of conversion of etch-and-rinse and self-etch adhesives light-cured using QTH or LED. *Oper Dent*; 6:649-654.

27. Ogliari FA, de Sordi ML, Ceschi MA, Petzhold CL, Demarco FF, Piva E (2006) 2,3-epithiopropyl methacrylate as functionalized monomer in a dental adhesive. *J Dent*;34:472-477.
28. Ogliari FA, Ely C, Lima GS, Conde MC, Petzhold CL, Demarco FF, Pive E (2008) Onium salt reduces the inhibitory polymerization effect from an organic solvent in a model dental adhesive resin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*; 86:113-118.

FIGURES

Monomer	Molecular Weight	Molecular Structure
HEMA	130	
Bis-EMA 10	805	
Bis-EMA 30	1686	
PEG 400	550 – 594	
PEG 400 UDMA	1139	
PEG 1000	1124 – 1168	

Fig. 1 Molecular weight and structure of the different monomers.

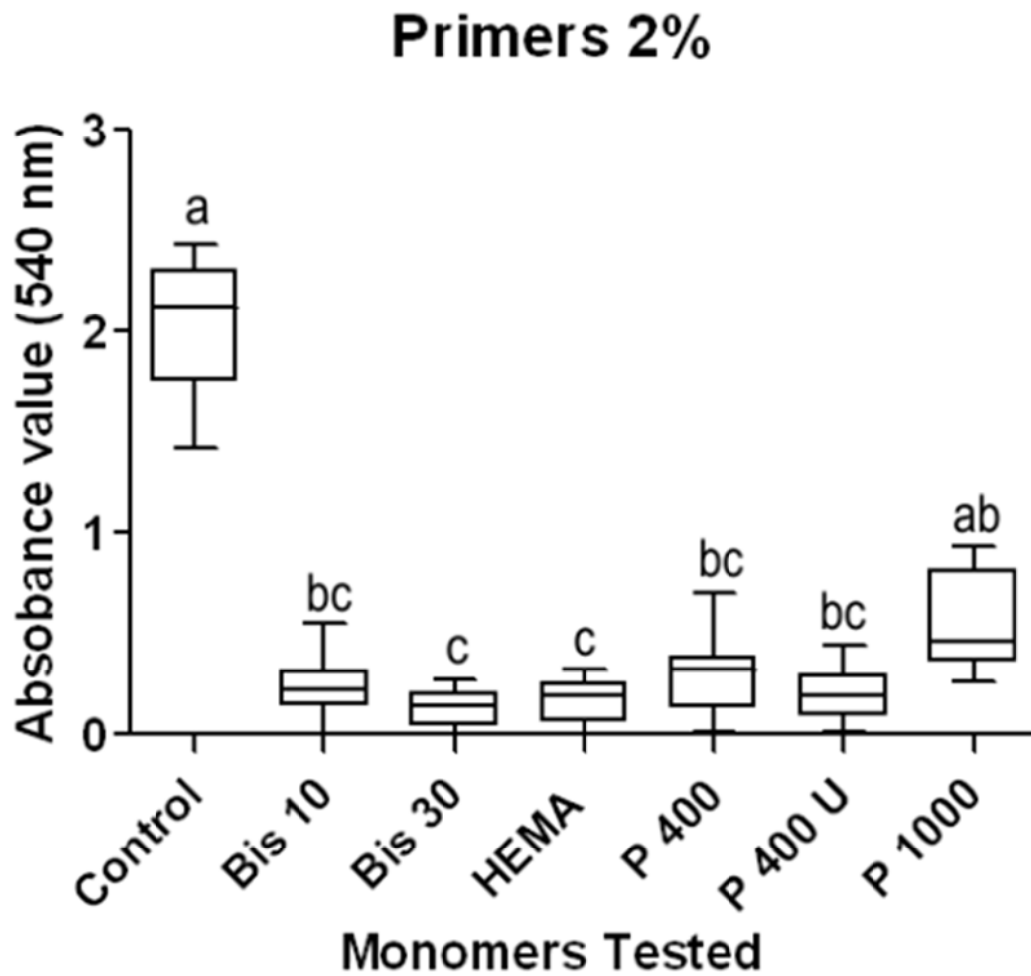


Fig. 2 Cytotoxic effect of the six different primers, in concentration of 2%, tested after 24hours of cell exposition. Absorbance values of each product in comparison with control group were represented. Different letters represent statistically significant differences between groups.

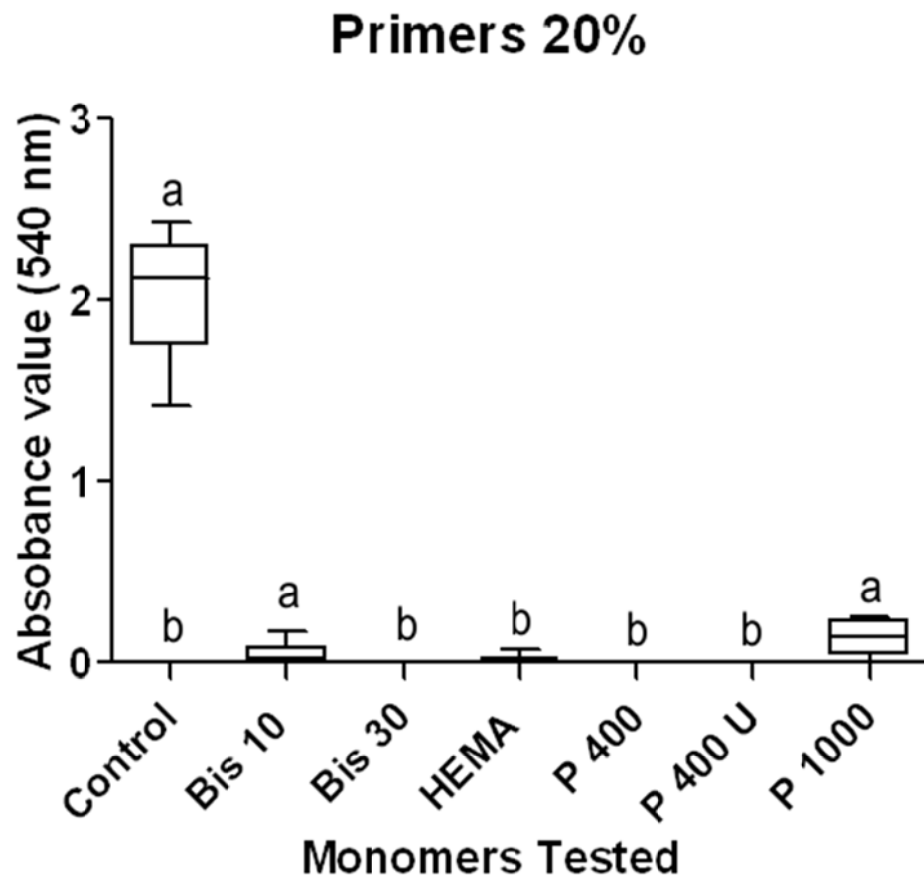


Fig. 3 Cytotoxic effect of the six different primers, in concentration of 20%, tested after 24hours of cell exposition. Absorbance values of each product in comparison with control group were represented. Different letters represent statistically significant differences between groups.

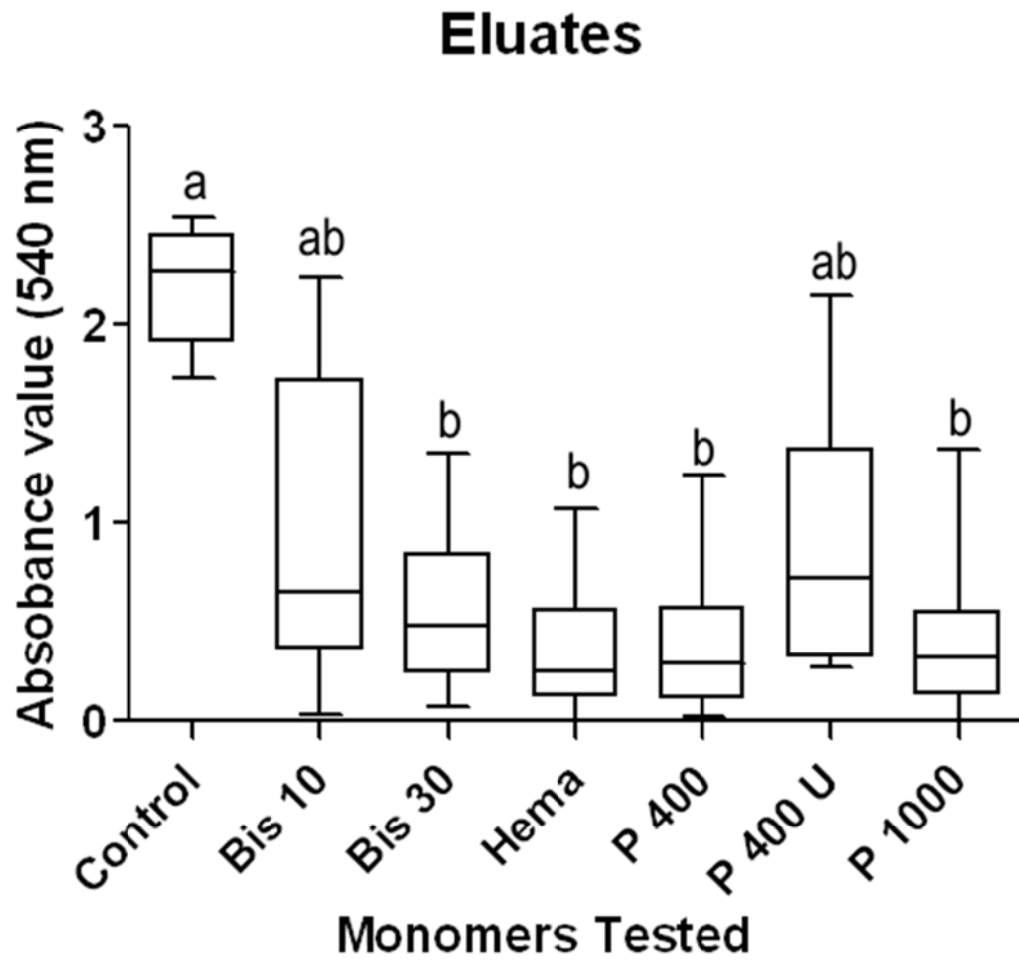


Fig. 4 Cytotoxic effect of the six different adhesives tested after 24hours of cell exposition in the eluate. Absorbance values of each product in comparison with control group were represented. Different letters represent statistically significant differences between groups.

TABLES

Table 1 Composition (% weight) of the experimental self-etching primers.

Monomer	Composition (% wt)			
	Surfactant	Ethanol	Water	GDMA-P
PEG 400	30	20	20	30
PEG 1000	30	20	20	30
Bis-EMA 10	30	20	20	30
Bis-EMA 30	30	20	20	30
PEG 400 UDMA	30	20	20	30
HEMA	30	20	20	30

GDMA-P is an equimolar mixture of glycerol dimethacrylate dihydrogen phosphate and glycerol tetramethacrylate hydrogen phosphate.

Table 2 Composition (% weight) of the experimental resin bonds.

Monomer	Surfactant	Composition (% w/w)				
		Bis-GMA	TEGDMA	CQ	DPI	EDAB
PEG 400	25	49	23.8	0.4	1	0.8
PEG 1000	25	49	23.8	0.4	1	0.8
Bis-EMA 10	25	49	23.8	0.4	1	0.8
Bis-EMA 30	25	49	23.8	0.4	1	0.8
PEG 400 UDMA	25	49	23.8	0.4	1	0.8
HEMA	25	49	23.8	0.4	1	0.8

Bis-GMA, 2,2-bis[4-(2-hydroxy-3-methacryloyloxypropyl)phenyl]-propane; TEGDMA, triethyleneglycol dimethacrylate; CQ, camphorquinone; EDAB, ethyl 4-dimethylaminebenzoate; DPI (diphenyliodonium hexafluorophosphate).

Table 3 Percentage of degree of conversion of the six adhesives tested.

Degree of conversion (%) – Adhesives						
	Bis-EMA 10	Bis-EMA 30	HEMA	PEG 400	PEG 400 UDMA	PEG 1000
	67,13077	63,08544	66,01846	70,32767	59,5379	75,0564
	86,73595	86,85087	55,02943	83,8492	62,44875	87,5617
	72,7015	68,89563	62,3434-	79,33314	61,47096	71,93872
	67,82707	65,92675	70,77353	69,828	72,70974	76,4884
	69,14739	57,514	66,21311	73,1118	69,03062	57,90696
MEANS	72,70846	68,45454	64,07599	75,28986	65,03917	73,79044

4 Conclusão

O presente estudo mostrou que estes monômeros dimetacrilatos têm o potencial de utilização em formulações de sistemas adesivos. Além disso, foi constatado um melhor desempenho do P1000, P400U e Bis 10 em relação ao grupo controle no quesito toxicidade, por isso, são necessários outros estudos para explorar as boas propriedades demonstradas, mesmo que empregando diferentes concentrações, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* (modelo animal).

5 Referências

- ARANHA, A. M.; GIRO, E. M.; SOUZA, P. P.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. **Dental Materials**, v.22, n.9, p.864-9, 2006.
- BOUILLAGUET, S.; WATAHA, J. C.; HANKS, C. T.; CIUCCHI, B.; HOLZ, J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of hema. **Journal of Endodontics**, v.22, n.5, p.244-8, 1996.
- BROWNE, R. M. Animal tests for biocompatibility of dental materials--relevance, advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, v.22 Suppl 2, p.S21-4, 1994.
- CARRILHO, M. R.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M. F.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; REIS, A. F.; HEBLING, J.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v.86, n.6, p.529-33, 2007.
- CARRILHO, M. R.; TAY, F. R.; DONNELLY, A. M.; AGEE, K. A.; TJADERHANE, L.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; FOULGER, S.; PASHLEY, D. H. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v.90, n.1, p.373-80, 2009.
- CARVALHO, R. V.; OGLIARI, F. A.; DE SOUZA, A. P.; SILVA, A. F.; PETZHOLD, C. L.; LINE, S. R.; PIVA, E.; ETGES, A. 2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2. **European Journal of Oral Sciences**, v.117, n.1, p.64-7, 2009.
- CETINGUC, A.; OLMEZ, S.; VURAL, N. Hema diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. **Dental Materials**, v.23, n.3, p.302-7, 2007.
- CONDE, M.C.; ZANCHI, C.H.; RODRIGUES-JUNIOR, S.A.; CARREÑO, N.L.; OGLIARI, F.A.; PIVA, E. Nanofiller loading level: Influence on selected properties of an adhesive resin. **Journal of Dentistry**, v. 37, n.5, p.331-335, 2009.
- COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v.41, n.2-3, p.321-32, 1976.
- DAHL, J. E. Potential of dental adhesives to induce mucosal irritation evaluated by the HET-CAM method. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.65, n.5, p.275-283, 2007.
- DURNER, J.; KREPPEL, H.; ZASPEL, J.; SCHWEIKL, H.; HICKEL, R.; REICHL, F. X. The toxicokinetics and distribution of 2-hydroxyethyl methacrylate in mice. **Biomaterials**, v.30, n.11, p.2066-71, 2009.
- FALCONI, M.; TETI, G.; ZAGO, M.; PELOTTI, S.; BRESCHI, L.; MAZZOTTI, G. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. **Cell Biology and Toxicology**, v.23, n.5, p.313-322, 2007.

FARIA-E-SILVA, AL.; LIMA, AF.; MORAES, RR.; PIVA, E.; MARTINS, L.R. Degree of conversion of etch-and-rinse and self-etch adhesives light-cured using QTH or LED. **Operative Dentistry**, v.35, n.6, p.649-54, 2010.

FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v.17, n.4-5, p.213-30, 2001.

FURUKAWA, M.; SHIGETANI, Y.; FINGER, W. J.; HOFFMANN, M.; KANEHIRA, M.; ENDO, T.; KOMATSU, M. All-in-one self-etch model adhesives: HEMA-free and without phase separation. **Journal of Dentistry**, v.36, n.6, p.402-8, 2008.

HAMID, A.; HUME, W. R. The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.24, n.1, p.20-5, 1997.

HANKS, C. T.; SUN, Z. L.; FANG, D. N.; EDWARDS, C. A.; WATAHA, J. C.; RITCHIE, H. H.; BUTLER, W. T. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. **Connective Tissue Research**, v.37, n.3-4, p.233-49, 1998.

HIRAISHI, N.; BRESCHI, L.; PRATI, C.; FERRARI, M.; TAGAMI, J.; KING, N. M. Technique sensitivity associated with air-drying of HEMA-free, single-bottle, one-step self-etch adhesives. **Dental Materials**, v.23, n.4, p.498-505, 2007.

HUANG, F. M.; CHOU, M. Y.; CHANG, Y. C. Dentin bonding agents induce c-fos and c-jun protooncogenes expression in human gingival fibroblasts. **Biomaterials**, v.24, n.1, p.157-63, 2003.

IKEMURA, K.; ICHIZAWA, K.; ENDO, T. Design of a new self-etching HEMA-free adhesive. **Dental Materials**, v.28, n.5, p.558-64, 2009.

IRELAND, A. J.; IRELAND, M. J.; SHERRIFF, M. Surfactants as part of a combined etchant and activator solution prior to the use of an anaerobic adhesive. **Dental Materials**, v.20, n.10, p.924-30, 2004.

KOSTORYZ, E. L.; DHARMALA, K.; YE, Q.; WANG, Y.; HUBER, J.; PARK, J. G.; SNIDER, G.; KATZ, J. L.; SPENCER, P. Enzymatic biodegradation of HEMA/bisGMA adhesives formulated with different water content. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v.88, n.2, p.394-401, 2009.

LANZA, C. R.; DE SOUZA COSTA, C. A.; FURLAN, M.; ALECIO, A.; HEBLING, J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. **Cell Biology and Toxicology**, v.25, n.6, p.533-43, 2009.

LIMA, G.D.A., S.; OGLIARI, F. A.; DA SILVA, E. O.; ELY, C.; DEMARCO, F. F.; CARRENO, N. L.; PETZHOLD, C. L.; PIVA, E. Influence of water concentration in an experimental self-etching primer on the bond strength to dentin. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v.10, n.3, p.167-72, 2008.

MAKELA, M.; SALO, T.; UITTO, V. J.; LARJAVA, H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. **Journal of Dental Research**, v.73, n.8, p.1397-406, 1994.

MINE, A.; DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K. L.; POITEVIN, A.; KUBOKI, T.; YOSHIDA, Y.; SUZUKI, K.; LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBEEK, B. Bonding

effectiveness and interfacial characterization of a hema/tegDMA-free three-step etch&rinse adhesive. **Journal of Dentistry**, v.36, n.10, p.767-73, 2008.

OGLIARI, F. A.; DE SORDI, M. L.; CESCHI, M. A.; PETZHOLD, C. L.; DEMARCO, F. F.; PIVA, E. 2,3-epithiopropyl methacrylate as functionalized monomer in a dental adhesive. **Journal of Dentistry**, v.34, n.7, p.472-7, 2006.

OGLIARI, F. A.; ELY, C.; LIMA, G. S.; CONDE, M. C.; PETZHOLD, C. L.; DEMARCO, F. F.; PIVA, E. Onium salt reduces the inhibitory polymerization effect from an organic solvent in a model dental adhesive resin. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v.86, n.1, p.113-8, 2008.

OGLIARI, F. A.; ELY, C.; ZANCHI, C. H.; FORTES, C. B.; SAMUEL, S. M.; DEMARCO, F. F.; PETZHOLD, C. L.; PIVA, E. Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. **Dental Materials**, v.24, n.2, p.165-71, 2008.

PAWLOWSKA, E.; POPLAWSKI, T.; KSIAZEK, D.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. **Mutation Research**, v.629, n.2, p.122-9, 2010.

POPLAWSKI, T.; PAWLOWSKA, E.; WISNIEWSKA-JAROSINSKA, M.; KSIAZEK, D.; WOZNIAK, K.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Cytotoxicity and genotoxicity of glycidyl methacrylate. **Chemico-Biological Interactions**, v.180, n.1, p.69-78, 2009.

RATHKE, A.; ALT, A.; GAMBIN, N.; HALLER, B. Dentin diffusion of hema released from etch-and-rinse and self-etch bonding systems. *European Journal of Oral Sciences*, v.115, n.6, p.510-6, 2007.

RENO, F.; TRAINA, V.; CANNAS, M. Adsorption of matrix metalloproteinases onto biomedical polymers: a new aspect in biological acceptance. **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**, v.19, n.1, p.19-29, 2008.

SANTOS, J.; CARRILHO, M.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; PASHLEY, D.; TAY, F.; FERRAZ, C.; TJADERHANE, L. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. **Journal of Endodontics**, v.35, n.5, p.686-9, 2009.

SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **Journal of Dental Research**, v.85, n.10, p.870-7, 2006.

TORKABADI, S.; NAKAJIMA, M.; IKEDA, M.; FOXTON, R. M.; TAGAMI, J. Bonding durability of HEMA-free and HEMA-containing one-step adhesives to dentine surrounded by bonded enamel. **Journal of Dentistry**, v.36, n.1, p.80-6, 2008.

VAN LANDUYT, K. L.; SNAUWAERT, J.; PEUMANS, M.; DE MUNCK, J.; LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBEEK, B. The role of HEMA in one-step self-etch adhesives. **Dental Materials**, v.24, n.10, p.1412-9, 2008.

WALTHER, U. I.; WALTHER, S. C.; LIEBL, B.; REICHL, F. X.; KEHE, K.; NILIUS, M.; HICKEL, R. Cytotoxicity of ingredients of various dental materials and related compounds in L2- and A549 cells. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.63, n.5, p.643-9, 2002.

ZANCHI, C. H.; ELISEU, A. M.; OGLIARI, F. A.; CHERSONI, S.; PRATI, C.; DEMARCO, F. F.; PIVA, E. A new approach in self-etching adhesive formulations: replacing HEMA for surfactant dimethacrylate monomers. **Dental Materials**, v.-, n.-, p.In process of submission, 2010.

ZANCHI, C. H.; MUNCHOW, E. A.; OGLIARI, F. A.; CHERSONI, S.; PRATI, C.; DEMARCO, F. F.; PIVA, E. Development of experimental hema-free three-step adhesive system. **Journal of Dentistry**, v.38, n.6, p.503-8, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Relatório estatística do primer 2%.

Controle n= 12, primer 2%

One Way Analysis of Variance

quarta-feira, março 02, 2011, 14:01:02

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Passed (P = 0,344)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

quarta-feira, março 02, 2011, 14:01:02

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%	
Controle	12	0	2,118	1,777	2,274	
Bis10 2%	10	0	0,218	0,158	0,301	0,0450 0,198
HEMA 2%	10	0	0,193	0,0800	0,240	
PEG400 2%	10	0	0,321	0,131	0,373	
P400UDMA 2%	10	0	0,193	0,112	0,275	
PEG1000 2%	10	0	0,466	0,368	0,770	

H = 46,367 with 6 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0,05
Controle vs Bis30 2%	48,750	5,440	Yes
Controle vs HEMA 2%	44,200	4,932	Yes
Controle vs P400UDMA 2%	40,400	4,508	Yes
Controle vs Bis10 2%	36,900	4,118	Yes
Controle vs PEG400 2%	31,250	3,487	Yes
Controle vs PEG1000 2%	14,500	1,618	No
PEG1000 2% vs Bis30 2%	34,250	3,659	Yes
PEG1000 2% vs HEMA 2%	29,700	3,173	Yes
PEG1000 2% vs P400UDMA 2%	25,900	2,767	No
PEG1000 2% vs Bis10 2%	22,400	2,393	Do Not Test
PEG1000 2% vs PEG400 2%	16,750	1,790	Do Not Test
PEG400 2% vs Bis30 2%	17,500	1,870	No
PEG400 2% vs HEMA 2%	12,950	1,384	Do Not Test
PEG400 2% vs P400UDMA 2%	9,150	0,978	Do Not Test
PEG400 2% vs Bis10 2%	5,650	0,604	Do Not Test
Bis10 2% vs Bis30 2%	11,850	1,266	Do Not Test
Bis10 2% vs HEMA 2%	7,300	0,780	Do Not Test
Bis10 2% vs P400UDMA 2%	3,500	0,374	Do Not Test
P400UDMA 2% vs Bis30 2%	8,350	0,892	Do Not Test
P400UDMA 2% vs HEMA 2%	3,800	0,406	Do Not Test
HEMA 2% vs Bis30 2%	4,550	0,486	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Apêndice B

Relatório estatística do primer 20%.

Controle n=12 primer 20%

One Way Analysis of Variance primer 20%

quarta-feira, março 02, 2011, 13:57:39

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

quarta-feira, março 02, 2011, 13:57:39

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Controle	12	0	2,118	1,777	2,274
Bis10 20%	10	0	0,0195	0,000	0,0710
Bis30 20%	10	0	0,000	0,000	0,000
HEMA 20%	10	0	0,000	0,000	0,0190
PEG400 20%	10	0	0,000	0,000	0,000
P400UDMA 20%10	0	0,000	0,000	0,000	0,000
PEG1000 20%	10	0	0,141	0,0530	0,233

H = 56,098 with 6 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0,05
Controle vs P400UDMA 20%	45,000	5,022	Yes
Controle vs PEG400 20%	45,000	5,022	Yes
Controle vs Bis30 20%	45,000	5,022	Yes
Controle vs HEMA 20%	37,100	4,140	Yes
Controle vs Bis10 20%	26,100	2,913	No
Controle vs PEG1000 20%	17,800	1,986	Do Not Test
PEG1000 20% vs P400UDMA 20%	27,200	2,906	No
PEG1000 20% vs PEG400 20%	27,200	2,906	Do Not Test
PEG1000 20% vs Bis30 20%	27,200	2,906	Do Not Test
PEG1000 20% vs HEMA 20%	19,300	2,062	Do Not Test
PEG1000 20% vs Bis10 20%	8,300	0,887	Do Not Test
Bis10 20% vs P400UDMA 20%	18,900	2,019	Do Not Test
Bis10 20% vs PEG400 20%	18,900	2,019	Do Not Test
Bis10 20% vs Bis30 20%	18,900	2,019	Do Not Test
Bis10 20% vs HEMA 20%	11,000	1,175	Do Not Test
HEMA 20% vs P400UDMA 20%	7,900	0,844	Do Not Test
HEMA 20% vs PEG400 20%	7,900	0,844	Do Not Test
HEMA 20% vs Bis30 20%	7,900	0,844	Do Not Test
Bis30 20% vs P400UDMA 20%	0,000	0,000	Do Not Test
Bis30 20% vs PEG400 20%	0,000	0,000	Do Not Test
PEG400 20% vs P400UDMA 20%	0,000	0,000	Do Not Test

Apêndice C

Relatório estatística do eludato.

One Way Analysis of Variance

domingo, setembro 26, 2010, 17:04:54

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

domingo, setembro 26, 2010, 17:04:54

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Bis 10	13	0	0,601	0,242	1,629
Bis 30	13	0	0,476	0,225	0,817
Hema	13	0	0,237	0,0995	0,451
P 400	13	0	0,282	0,107	0,497
P 400 U	13	0	0,586	0,287	1,367
P 1000	13	0	0,320	0,0812	0,429
Controle	10	0	2,273	1,919	2,442

H = 33,542 with 6 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0,05
Controle vs Hema	52,569	4,892	Yes
Controle vs P 1000	49,685	4,624	Yes
Controle vs P 400	49,492	4,606	Yes
Controle vs Bis 30	40,954	3,811	Yes
Controle vs Bis 10	32,223	2,999	No
Controle vs P 400 U	30,954	2,881	Do Not Test
P 400 U vs Hema	21,615	2,157	No
P 400 U vs P 1000	18,731	1,869	Do Not Test
P 400 U vs P 400	18,538	1,850	Do Not Test
P 400 U vs Bis 30	10,000	0,998	Do Not Test
P 400 U vs Bis 10	1,269	0,127	Do Not Test
Bis 10 vs Hema	20,346	2,030	Do Not Test
Bis 10 vs P 1000	17,462	1,743	Do Not Test
Bis 10 vs P 400	17,269	1,723	Do Not Test
Bis 10 vs Bis 30	8,731	0,871	Do Not Test
Bis 30 vs Hema	11,615	1,159	Do Not Test
Bis 30 vs P 1000	8,731	0,871	Do Not Test
Bis 30 vs P 400	8,538	0,852	Do Not Test
P 400 vs Hema	3,077	0,307	Do Not Test
P 400 vs P 1000	0,192	0,0192	Do Not Test
P 1000 vs Hema	2,885	0,288	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Apêndice D

Zimografia mostrando que não houve inibição na expressão das metaloproteinases pelos monômeros testados.

